

Oponentský posudek doktorské disertační práce

Jan Tykvart : Charakterizace glumátkarboxypeptidasy II, jejích blízkých homologů a jejich interakcí s ligandy.

Tématem doktorské disertační práce Mgr. Jana Tykvarta bylo studium proteinu glutamátkarboxypeptidasy II (GCPII) a jejích blízkých homologů. GCPII je protein vyskytující se na buňkách karcinomu prostaty, je exprimován v neovaskulatuře řady pevných nádorů a velmi významná je i jeho přítomnost v nervové tkáni. Studium tohoto proteinu má rovněž značný klinický význam, neboť představuje jak důležitý diagnostický marker, tak i potenciální terapeutický cíl pro celou řadu významných chorob. Molekula GCPII má navíc několik blízkých homologů, jejichž role není zatím dostatečně objasněna a jejichž blízká podobnost molekule GCPII občas mírně znepráhledňuje výzkum v této oblasti.

Práce Mgr. Jan Tykvarta má 120 stran, obsahuje 11 obrázků, 3 tabulky a 203 citací; je celá psána velmi dobrou angličtinou. Disertační práce je založena na 3 odborných článcích, publikovaných během uplynulých 3 let. Mgr. Jan Tykvart je ve všech případech na článku uveden jako první autor. Kromě toho je kandidát spoluautorem 4 dalších vědeckých publikací, z nichž poslední vyšla teprve před několika týdny a není proto ještě ani uvedena v přiloženém autoreferátu. Všechny tyto práce spadají tematicky do stejného vědeckého okruhu, charakterizovaného titulem této disertace. V úvodu práce Mgr. Jana Tykvarta je velmi přehledně popsána problematika výzkumu GCPII, role této molekuly v různých patologických stavech a její klinický význam. Jsou zde popsány i různé homology této molekuly. Následuje kapitola výsledků obsahující 3 výše zmíněné vědecké publikace, přičemž je každá uvedena krátkým vysvětlením motivace práce, souhrnem výsledků v dané práci obsažených a specifikací příspěvku kandidáta k jejímu vzniku. Celá práce je zakončena diskusí, v níž jsou získané výsledky okomentovány a zařazeny do odpovídajícího kontextu.

Podle mého mínění se jedná o vynikající práci, týkající je neobyčejně důležitého úseku základního výzkumu. Ke kvalitě práce jistě přispěl i fakt, že byla vypracována v laboratoři, která má s uvedenou tematikou dlouholetou zkušenost a která v oblasti výzkumu GCPII představuje jedno z klíčových pracovišť. Každá ze tří publikací, na nichž je tato dizertace založena, představuje jeden specifický úhel pohledu. První článek je popisem nového expresního a purifikačního postupu, který umožňuje relativně rychlou a snadnou přípravu *in vivo* biotinylovaného proteinu ve velkém množství. Druhá publikace představuje srovnání 13 nejpoužívanějších monoklonálních protilátek proti GCPII a jejich bližší charakterizaci, pokud se týká specifity, síly vazby a dobře rozlišuje rozpoznávání nativního či denaturovaného proteinu. Třetí z článků, který je v porovnání se dvěma předchozími z vědeckého hlediska zřejmě nejvýznamnější, představuje charakterizaci NAALADasy L, která je blízce příbuzná molekule GCPII. Tato charakterizace se dotýká expresního profilu této molekuly, enzymové aktivity i její 3D struktury zjištěné pomocí rentgenové difrakční analýzy proteinových krystalů. Získané výsledky jsou velmi hojné a navíc do jisté míry překvapivé, neboť tomuto enzymu byla v literatuře doposud přiřazována jiná enzymová aktivita.

Rád bych kandidáta poprosil o zodpovězení následujících dotazů:

- A. Studovaná protilátka YPSMA-1 rozpoznává lidskou, ale nikoliv myší variantu GCPII. V publikaci č. 2 je naznačeno, že rozdíl může být způsoben v oblasti Lys 482. Výrobce této protilátky přitom udává, že protilátka rozpoznává na lidské GCPII epitop v oblasti 716-723. Pokuste se okomentovat tento rozdíl názorů.
- B. Ve své práci zmiňujete, že protein GCPIII, který je blízce příbuzný proteinu GCPII dokáže měnit svoji enzymovou specifitu na základě přítomnosti různých kationtů ve své struktuře. Dá se podle Vašeho názoru předpokládat podobný jev u nově charakterizované NAALADasy L, nebo byl takový jev dokonce už testován?
- C. Při vysvětlování rozdílů mezi detekcí exprese NAALADasy L na úrovni RNA a na úrovni proteinů zmiňujete řadu exonů, v jejichž oblasti zřejmě dochází u této molekuly k alternativnímu sestřihu. Šlo by tyto oblasti ukázat v kontextu 3D struktury a případně uvažovat o jejich funkčním významu?

Na závěr bych ještě jednou rád zdůraznil, že kandidát podle mého mínění svojí předkládanou disertací velmi dobře prokázal předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a plně souhlasím s tím, aby tato práce byla přijata k další obhajobě.

V Praze, 11. května 2015

RNDr. Jiří Pavlíček, Ph.D.